บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1

1. การปรับมาตรฐานการตรวจ

1.1. ปรับความแม่นยำ (reliability) ในการตรวจ โดยทำการตรวจซ้ำในตัวอย่างที่ได้ตรวจไปแล้วจำนวน 20 คน

1.2 ปรับความเชื่อถือได้ในการตรวจ โดยทำการตรวจในตัวอย่างเดียวกับอาจารย์ที่ปรึกษาจำนวน 20 คน

2. เลือกตัวอย่าง จากผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาที่ภาควิชาเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ ในระหว่างปีการศึกษา 2537 ที่มีอายุตั้งแต่ 13 ปี จำนวน 268 คน

3. ทำการซักประวัติเกี่ยวกับโรคประจำตัว การใช้ยาจำพวกสเตียรอยด์ หรือยาปฏิชีวนะ และการรักษาทางปริทันต์

4. ทำการตรวจอวัยวะปริทันต์ โดยใช้เครื่องมือโพรบขององค์การอนามัยโลก (Hu-Friedy ®) ร่วมกับกระจกส่องปาก (ภาพที่ 2) โดยทำการตรวจในฟัน 10 ซี่ จาก 6 เซคแตนท์ ได้แก่

#16,17	#11	#26,27
#46,47	#31	#36,37

และใช้เกณฑ์ของดัชนี CPITN และดัชนีการสูญเสียการยึดเกาะ ดังนี้

<u>เกณฑ์การให้คะแนนของดัชนี CPITN (Community Periodontal Index of Treatment Needs)</u>

ระดับ 0 ไม่มีอาการแสดงของโรคปริทันต์

ระดับ 1 มีเลือดออกจากร่องเหงือกหลังจากการตรวจด้วยโพรบ

ระดับ 2 มีหินน้ำลายเหนือเหงือก หรือ ใต้เหงือก

ระดับ 3 มีร่องลึกปริทันต์ลึกระหว่าง 4–5 มม.

ระดับ 4 มีร่องลึกปริทันต์ลึกมากกว่าหรือเท่ากับ 6 มม.

<u>เกณฑ์การให้คะแนนของดัชนีการสูญเสียการยึดเกาะ (Loss of Attachment Index)</u>

ระดับ 0 สูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 มม.

ระดับ 1 " " 4-5 มม.

ระดับ 2 " " 6-8 มม.

ระดับ 3 " " 9-11 มม.

ระดับ 4 " " มากกว่าหรือเท่ากับ 12 มม.

ระดับ 9 การสูญเสียการยึดเกาะไม่สามารถวัดได้ เช่น ไม่เห็นรอยต่อเคลือบฟัน-เคลือบรากฟัน หรือใส่ครอบฟัน

5. บันทึกผลการตรวจตามเกณฑ์ของดัชนีทั้ง 2 ลงในแบบบันทึกการสำรวจ โดย บันทึกเฉพาะค่าที่สูงที่สุดของแต่ละเซคแตนท์เท่านั้น และถ้าเซคแตนท์ใดเหลือฟันเพียง 1 ซี่ ให้รวมฟันซี่ที่เหลือไปอยู่ในเซคแตนท์ที่อยู่ติดกัน และเซคแตนท์นั้นให้ถือว่าเป็นเซคแตนท์ที่ไม่มีฟัน

6. นำผลที่ได้มาคำนวณทางสถิติดังนี้

6.1 ร้อยละของผู้ป่วยที่มีสภาพของอวัยวะปริทันต์ตามดัชนี CPITN ระดับต่างๆ โดยดูจากระดับที่สูงที่สุดของผู้ป่วยแต่ละคน

6.2 ร้อยละของเซคแตนท์ที่มีสภาพของอวัยวะปริทันต์ตามดัชนี CPITN ระดับต่างๆ

6.3 ร้อยละของผู้ป่วยที่มีการสูญเสียการยึดเกาะระดับต่างๆ โดยดูจากระดับที่สูงที่สุดของผู้ป่วยแต่ละคน

6.4 ร้อยละของเซคแตนท์ที่มีการสูญเสียการยึดเกาะระดับต่างๆ

ตอนที่ 2

1. การเตรียมสารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารถ่ายโอนเชื้อ (transfer media)

- เบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น (Difco , USA) (brain heart infusion)	12.5 กรัม
- อะการ์ (Difco) (agar)	500 มิลลิกรัม
- แอล-ซิสติอีน-ไฮโดรคลอไรด์-โมโนไฮเดรต (Sigma , USA) (L-cystein-HCl-H_2O)	250 มิลลิกรัม
- น้ำกลั่น	500 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากันที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส จนเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดละ 2 มิลลิลิตร ปิดฝาหลวมและนำเข้าตู้อบความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปิดฝาแน่นทันทีขณะร้อน นำเข้าตู้อบเชื้อสูญญากาศ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปใช้เก็บเชื้อทันที

1.2 สารละลายที่ใช้สำหรับเจือจาง (dilution solution)

- สารละลายเกลือ 1	37.5 มิลลิลิตร
- สารละลายเกลือ 2	37.5 มิลลิลิตร
- อะการ์ (Difco)	500 มิลลิกรัม
- 0.05 % รีซัสซูริน (Sigma) (Resazurin solution)	1 มิลลิลิตร

- น้ำกลั่น 910 มิลลิลิตร
- แอล-ซิสติอีน-ไฮโดรคลอไรด์-โมโนไฮเดรต (Sigma) 500 มิลลิกรัม
- โซเดียมคาร์บอเนต (Sigma) 200 มิลลิกรัม
(Sodium Carbonate)
- 25 % กรดแอล-แอสคอร์บิค (Riedel , Germany) 2 มิลลิลิตร
(L-Ascorbic acid)

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน และปรับความเป็นกรดด่าง (pH) ให้ได้ 6.7 ± 0.1 จะได้สารละลายสีชมพู แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร เข้าอบในตู้อบความดันไอน้ำเช่นเดียวกับอาหารถ่ายโอนเชื้อ ปิดฝาแน่นทันทีขณะร้อน

หมายเหตุ สารละลายเกลือ 1
- ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Riedel)
(K_2HPO_4) 3.5 กรัม
- น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

สารละลายเกลือ 2
- โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Riedel)
(KH_2PO_4) 2.35 กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ (Merck , Germany)
(NaCl) 5.09 กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต (Merck) 6 กรัม
($(NH_4)_2SO_4$)
- แคลเซียมคลอไรด์ (Merck) 600 มิลลิกรัม
($CaCl_2$) (Merck)
- แมกนีเซียมซัลเฟตโมโนไฮเดรต (Riedel)
($MgSO_4 . H_2O$) 1.25 กรัม
- น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 ทริปติเคสซอยอะการ์ (trypticase soy agar) ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะ (non selective media)

- ทริปติเคสซอยอะการ์ (Difco) 40 กรัม
- น้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน และนำเข้าตู้อบความดันไอน้ำ รอจนอุณหภูมิลดลงถึง 45 องศาเซลเซียส จึงเติม

- เลือดม้า (สภากาชาดไทย) 50 มิลลิลิตร
- สารละลายฮีมินและวิตามินเค 10 มิลลิลิตร
  (Hemin+vit.K stock solution)

1.4 ทริปติเคสซอยกานามัยซินอะการ์ (trypticase soy kanamycin agar) ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ สำหรับเชื้อแบคทีรอยดิสที่สร้างเม็ดสีดำ (black - pigmented *Bacteroides* selective media)

- ทริปติเคสซอยอะการ์ 40 กรัม
- น้ำกลั่น 986 มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกันแล้วนำเข้าอบในตู้อบความดันไอน้ำ รอจนอุณหภูมิลดลงถึง 45 องศาเซลเซียส จึงเติม

- เลือดม้า 50 มิลลิลิตร
- สารละลายฮีมินและวิตามินเค 10 มิลลิลิตร
- สารละลายกานามัยซินซัลเฟต (12.5 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร)
  (kanamycin sulfate) 4 มิลลิลิตร

หมายเหตุ สารละลายฮีมินและวิตามินเค

- ฮีมิน (Sigma) 50 มิลลิกรัม
  (hemin)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 % (Merck) 0.5 มิลลิลิตร
  (NaOH)
- น้ำกลั่น 98.5 มิลลิลิตร

นำฮีมินและโซเดียมไฮดรอกไซด์ ละลายให้เข้ากันจึงเติมน้ำกลั่น นำเข้าตู้อบความดันไอน้ำ ทิ้งไว้จนเย็นจึงเติม

- วิตามินเค 1 (Roche , Switzerland) 1 มิลลิลิตร
(vitamin K1 10 mg. / ml.)

2. การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก

2.1 เลือกตัวอย่างจากตอนที่ 1 จำนวน 30 คน ที่จะทำการเก็บคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกเพื่อตรวจหาเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

2.1.1 กลุ่มตัวอย่างที่มีบริเวณเหงือกปกติ คือผู้ที่มีระดับของดัชนี CPITN เท่ากับ 0 อย่างน้อย 3 เซคแตนท์ และระดับสูงสุดไม่เกิน 2

2.1.2 กลุ่มตัวอย่างที่มีบริเวณโรคปริทันต์อักเสบ คือ ผู้ที่มีระดับของดัชนี CPITN สูงสุดเท่ากับ 4 และต้องมีระดับ 4 ที่ฟันกรามบนซี่ที่ 1 หรือ 2

โดยตัวอย่างในตอนที่ 2 นี้จะต้องเป็นไปตามข้อตกลงเบื้องต้น คือ ไม่มีโรคทางระบบใด ๆ ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ สารสเตียรอยด์ หรือได้รับการรักษาทางปริทันต์ ภายในระยะเวลา 3 เดือน

2.2 เลือกบริเวณที่จะเก็บตัวอย่าง จากฟันกรามบนซี่ที่ 1 หรือ 2 เพียง 1 บริเวณในตัวอย่างแต่ละคน โดยในบริเวณที่เลือกจะต้องอยู่ในระดับ 0 ของดัชนี CPITN สำหรับกลุ่มเหงือกปกติ และอยู่ในระดับ 4 สำหรับกลุ่มโรคปริทันต์อักเสบ

2.3 กำจัดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือก โดยใช้ก้อนสำลีขนาดเล็ก (cotton pellet) ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

2.4 ใช้แท่งกระดาษซับคลองรากฟัน (paper point) ขนาดกลาง (medium) ที่ได้ผ่านการอบด้วยตู้อบความดันไอน้ำ จำนวน 1 แท่งสอดลงไปในร่องลึกปริทันต์จนรู้สึก

มีแรงต้าน (ภาพที่ 3) ทิ้งไว้นาน 30 วินาที จึงนำแท่งกระดาษซับออกใส่ลงในอาหารถ่ายโอนเชื้อที่เตรียมไว้

3. การเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการ

3.1 นำหลอดทดลองที่เก็บคราบจุลินทรีย์แล้วมาสั่นผสมด้วยเครื่อง vortex mixer เพื่อให้เชื้อกระจายตัว เป็นเวลา 60 วินาที

3.2 นำสารที่ได้จากข้อ 3.1 มาเจือจางเป็นลำดับขั้น (serial dilution) ด้วยสารละลายที่ใช้สำหรับเจือจาง ให้ได้สารละลายเจือจาง 10 100 และ 1000 เท่าตามลำดับ

3.3 นำสารละลายเจือจาง 10 100 และ 1000 เท่า ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ไปกระจาย (spread) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะความเข้มข้นละ 2 จาน และอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะ 2 จาน แล้วนำเข้าอบในตู้อบแอนแนโรบิค (anaerobic chamber) (ภาพที่ 4) ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีไนโตรเจน 85 % คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และ ไฮโดรเจน 10 % เป็นเวลา 7 วัน

4. นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะ ที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30 - 300 โคโลนี โดยใช้เครื่องนับโคโลนี (Suntex , Taiwan) (ภาพที่ 5)

5. นับจำนวนของโคโลนีของ *P. gingivalis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ โดยการนำโคโลนีที่มีลักษณะกลม สีดำ หรือ น้ำตาล (ภาพที่ 6) ไปทดสอบว่าเป็น *P. gingivalis* โดย

5.1 การย้อมแกรม ซึ่งมีวิธีการดังนี้

- ใช้ลวดเผาไฟตักบางส่วนของโคโลนี ขึ้นมาละลายในหยดน้ำที่อยู่บนแผ่นแก้ว (glass slide) รอจนแห้ง

- เทสารละลายคริสตัลไวโอเลต (crystal violet solution) ลงในบริเวณที่มีเชื้ออยู่ ทิ้งไว้นาน 1 นาที จึงล้างด้วยน้ำ

- ย้อมด้วยสารละลายลูกอล (lugol's solution) ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

- ล้างด้วยแอลกอฮอล์ (95% alcohol) เป็นเวลา 10 - 15 วินาที แล้วล้างน้ำ

- ย้อมทับด้วยสารละลายแซฟรานิน (safranin solution) ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

5.2 นำโคโลนีไปละลายในเมทานอล (absolute methanol) แล้วจึงนำไปส่องดูการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร (Vilber Loumat , France) (ภาพที่ 7)

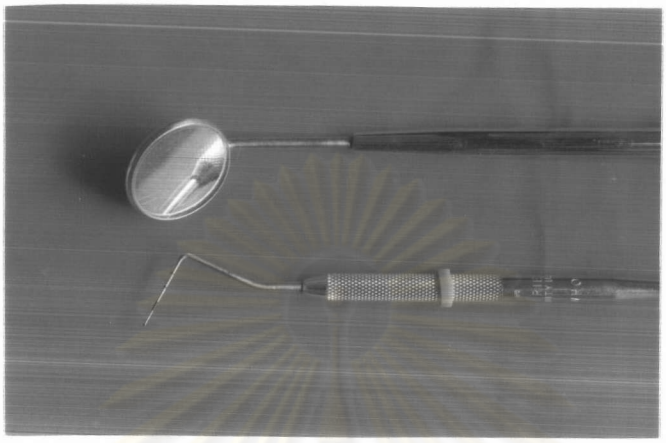
โคโลนีของ *P. gingivalis* คือโคโลนีที่ไม่มีการเรืองแสง (ภาพที่ 8) และเมื่อย้อมแกรมเห็นเป็นเซลล์รูปร่างแท่งติดสีแกรมลบ (ภาพที่ 9)

6. นำค่าที่ได้มาคำนวณทางสถิติ ดังนี้

6.1 สัดส่วนของ *P. gingivalis* ต่อเชื้อทั้งหมดที่ขึ้นในตู้อบแอนแนโรบิค

6.2 ความแตกต่างของสัดส่วน *P. gingivalis* ระหว่างกลุ่มโรคปริทันต์อักเสบ และเหงือกปกติ โดยใช้สถิติ Mann - Whitney U test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แสดงเครื่องมือโพรบขององค์การอนามัยโลก และกระจกส่องปาก

ภาพที่ 3 แสดงการเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก โดยใช้กระดาษซับคลองรากฟัน

ภาพที่ 4 แสดงตู้อบแอนแนโรบิค

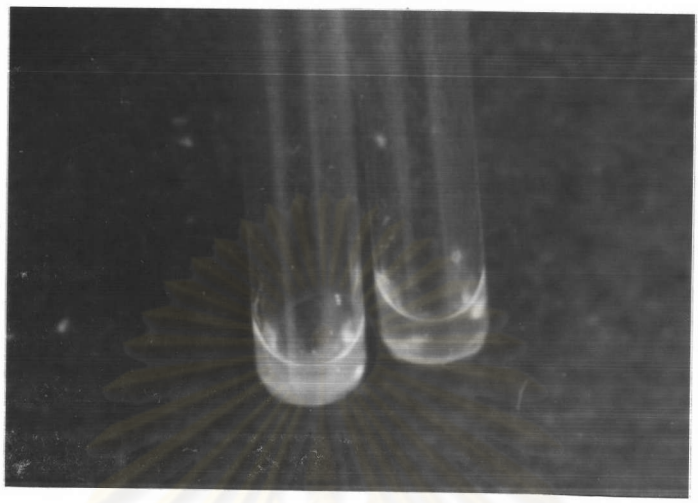
ภาพที่ 5 แสดงเครื่องนับโคโลนี

ภาพที่ 6 แสดงลักษณะโคโลนีสีน้ำตาลเข้มของ *P. gingivalis*

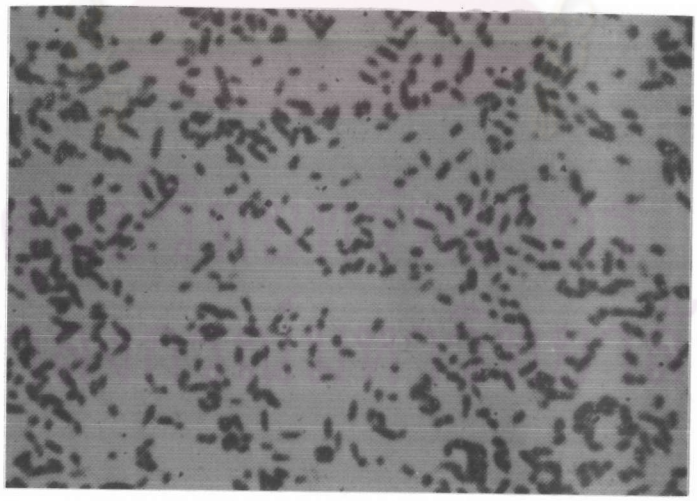
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 7 แสดงเครื่องกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเลต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 8 แสดงการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต (หลอดทางซ้ายมือมีการเรืองแสง ส่วนหลอดทางขวามือไม่มีการเรืองแสง)



ภาพที่ 9 แสดงการย้อมติดสีแกรมของ *P. gingivalis* เห็นเป็นรูปร่างแท่งติดสีแกรมลบ